

Pihlajanrengaslaikkuvirus Suomessa

Ida Laine

Maisterintutkielma

Helsingin Yliopisto

Maataloustieteiden laitos

Kasvipatologia

2015



Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department Maataloustieteiden laitos
Tekijä/Författare – Author Ida Liisa Laine		
Työn nimi / Arbetets titel – Title Pihlajanrengaslaikkuvirus Suomessa		
Oppiaine / Läroämne – Subject Kasvopatologia		
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year Huhtikuu 2015	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 47
Tiivistelmä/Referat – Abstract Pihlajalla (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) on vankat perinteet suomalaisessa maisemassa niin suosituimpana pihapuuna kuin puistoissa ja viherrakentamisessakin. Se on vaatimaton ja kestävä laji, joka kasvaa lähes missä vain ja valtaa nopeasti alaa vesojensa ja siementensä avulla. Metsätaloudellisesti sitä pidetään yleensä roskapuuna. Pihlajasta on jalostettu myös marjantuotantoon sopivia lajikkeita, makeapihlajia. Pihlajan taudeista tiedetään melko vähän, sillä se ei lajina ole taloudellisesti kovin merkittävä. Sen tiedetään sietävän hyvin latvuston ja juuriston tuhoja. Kuitenkin jo 50-luvulta lähtien on ympäri Eurooppaa raportoitu kloroottisista rengaslaikkuoireista pihlajan lehdistä, ja oireiden on todettu siirtyvän oksastuksessa sairaasta kasvista terveeseen. Vasta 2000-luvulla oireiden aiheuttajaksi varmistui aiemmin tuntematon, neljästä yksijuosteisesta RNA-rihmasta koostuva pihlajanrengaslaikkuvirus, EMARAV. Tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää löytyykö suomalaisista rengaslaikkuoireisista ja oireettomista pihlajista EMARAV-sekvenssi ja testata RT-PCR:ää sekä dot blot -hybridisaatiota viruksen tunnistamisessa. Eri puolilta Suomea kesäkuussa 2007 kerätyistä 73 lehtinäytteestä jokainen antoi positiivisen tuloksen dot blot -hybridisaatiossa. Näistä 17 näytettä oli peräisin täysin oireettomista puista. RT-PCR:ssä virussekvenssiä saatiin monistetuksi 54 näytteestä. Ongelmia aiheuttivat eristettyjen RNA-näytteiden epäpuhtaudet. Tulosten mukaan EMARAV on Suomessa erittäin yleinen virus pihlajalla ja esiintyy yleisesti myös latenttina infektiona.		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Sorbus aucuparia</i> L., pihlaja, rengaslaikku, virus, EMARAV, <i>Emaravirus</i> , dot blot		
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Maataloustieteiden laitos ja Viikin kampuskirjasto		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Työtä ohjasivat professori Jari Valkonen ja Anu Kallinen		

Sisällys

1 Johdanto	5
2 Katsaus kirjallisuuteen	6
2.1 Pihlaja.....	6
2.2 Virukset kasvitaudinaiheuttajina	7
2.2.1 Pihlajan virukset	10
2.2.2 Emaravirukset	11
2.2.3 Pihlajanrengaslaikkuvirus, EMARAV	13
3 Tutkimuksen tavoitteet.....	16
4 Tutkimusaineisto ja –menetelmät	17
4.1 Näytteet	17
4.2 RNA:n eristäminen	18
4.2.1 Toteutus	19
4.3 RT-PCR.....	21
4.3.1 Toteutus	22
4.4 RNA-koettimen valmistaminen	23
4.4.1 Toteutus	24
4.4.2 Ligaatio.....	24
4.4.3 Transformaatio	25
4.4.4 Minilysaatti-kasvatus plasmidi-DNA:n eristykseen	26
4.4.5 Plasmidi-DNA:n eristys (Zhou ym. 1990) ja sekvensointi	27
4.4.6 Plasmidi-DNA:n digestio koettimen valmistusta varten	27
4.4.7 DIG-RNA-leimaus.....	28
4.4.8 Koettimen leimauksen tarkistus.....	29
4.5 Dot blot -hybridisaatio	31
4.5.1 Toteutus	33

5 Tulokset	35
6 Tulosten tarkastelu	40
7 Johtopäätökset	40
8 Kiitokset	41
9 Lähteet.....	42

1 Johdanto

Pihlaja (*Sorbus aucuparia*) on lauhkealla ilmastovyöhykkeellä yleisesti tavattava pieni puu tai pensas, jonka taloudellinen arvo perustuu lähinnä sen suosioon piha- ja puistopuuna. Sen marjat ovat tärkeää ravintoa linnuille ja monille luonnon varaisille eläimille ja hyvin ravinnerikkaita. Pihlajasta onkin jalostettu myös marjantuotantoon sopivampia lajikkeita, makeapihlajia. Pihlajalla tavataan muutamia tauteja ja tuholaisia, mutta kaiken kaikkiaan se on hyvin kestävä ja vähään tyytyvä laji.

Pihlajaa infektoivia kasviviruksia tunnetaan muutamia, mutta merkittävin niistä on pihlajanrengaslaikkuvirus, EMARAV. Ensimmäiset raportit pihlajien lehdistä esiintyvistä rengaslaikuista ovat jo 50-luvulta (Jamalainen 1957), mutta itse virus löydettiin vasta tämän vuosituhannen puolella (Benthack ym. 2005). Tähän päivään mennessä pihlajanrengaslaikkuvirus on löydetty pihlajista eripuolilta Eurooppaa, ja siitä on tehty uuden virussuvun, *Emaravirus*, mallilaji.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin, löytyykö pihlajanrengaslaikkuvirusta Suomesta kerätyistä pihlajanlehtinäytteistä. Todentamismenetelminä käytimme polymeerasiketjureaktioon (RT-PCR) ja dot blot – hybridisaatioon perustuvaa tunnistusta.

2 Katsaus kirjallisuuteen

2.1 Pihlaja

Pihlajat (*Sorbus spp.*) ovat *Rosaceae*-heimoon kuuluvia pieniä puita tai pensaita. *Sorbus*-sukuun kuuluu yli 90 kasvilajia ympäri maailmaa. Suomessa luonnonvaraisia lajeja on neljä, joista vain pihlaja (kotipihlaja) eli *Sorbus aucuparia* L. esiintyy runsaana koko maassa. Lapissa tavattava pohjanpihlaja on *S. aucuparian* alalaji ((*S. aucuparia ssp. glabrata*) (Wimm. & Grab.) Cajander), suomenpihlajaa (*Sorbus hybrida* L.) ja ruotsinpihlajaa (*Sorbus intermedia* (Ehrh.) Pers.) tavataan vain Lounais-Suomessa ja Ahvenanmaalla. Ahvenanmaalla tavataan myös harvinaisia pihlajan, suomenpihlajan ja ruotsinpihlajan risteymiä (Salminen 2014).

Pihlaja on pienehkö puu tai pensas, joka kasvaa kasvupaikastaan riippuen muutamista metreistä aina kymmenmetriseksi saakka. Se on yleensä monirunkoinen ja haaroittuva ja kasvaa lähes missä vain, maastosta riippumatta. Se on lajina hyvin monimuotoinen ja siitä on olemassa erilaisia muunnoksia, kuten riippa- ja pylväspihlaja.

Pihlajan lehdet ovat parilehdykkäiset, lehdykät soikeita, sahalaitaisia ja alapuolelta karvaisia (Salminen 2014). Pihlajan syysväritys on purppuran punainen.

Kukinto on tiivis, vaalea tai kellertävä kerrannaishuiskilo, halkaisijaltaan noin kymmenen senttimetriä. Kukat ovat pieniä ja voimakastuoksuisia. Tuoksu houkuttelee hyönteisiä. Pihlaja onkin pääasiassa hyönteispölytteinen. Se on yksikotinen ja kaksineuvoinen ja tarvitsee ristipölytyksen.

Sen hedelmät ovat punaisia tai oranssinpunaisia, yleensä 3-siemenisiä, pyöreitä ja marjamaisia pohjushedelmiä. Ne kelpaavat ravinnoksi monille linnuille ja metsän eläimille, kuten ihmisellekin. Pihlajan ”marjat” ovat hyvin C-vitamiinipitoisia, ja ihminen on hyödyntänyt niitä ravinnossaan ja luonnonlääketieteessä jo kauan. Pihlajan marjoja ravintonaan käyttävät linnut ja nisäkkäät levittävät sen siemeniä, mikä onkin pihlajan siementen pääasiallinen leviämistapa (Raspé ym. 2000).

Pihlaja lisääntyy suvullisesti siemenistä ja suvuttomasti tyvi-, juuri-, runko-, kanto- ja rönsyvesoista. Lisääntyminen on erittäin tehokasta, minkä vuoksi pihlaja onkin pioneerilaji. Hakkuuaukea täyttyy usein nopeasti pihlajan vesoista.

Metsätaloudellisesti pihlajaa pidetään yleensä roskapuuna, mutta viherrakentamisessa, puistoissa ja pihapuuna se on suosittu. Se on Suomen suosituin pihapuu (Alanko ja Kahila 1994) ja yleisin pensas (Alanko 1988). Myös huonekaluteollisuus ja erikoispuusepät antavat sille arvoa erittäin lujan ja sitkeän puuaineksen vuoksi.

Metsätaloudessa pihlajaa käytetään maittavuutensa vuoksi jonkin verran ns. houkutuskasvina, jotta hirvet ja peurat saadaan pysymään poissa taimikoista (Salminen 2014). Pihlajalla on vahvat perinteet kalevalaisessa maisemassa, luonnonlääketieteessä ja etenkin maalaispihojen koristepuuna, mistä se on saanut nimityksensä kotipihlaja.

2.2 Virukset kasvitaudinaiheuttajina

Virukset ovat nukleoproteiineja, jotka toimivat muiden mikro-organismien lailla sillä erotuksella, että niillä ei ole omaa aineenvaihduntaa ja ne pystyvät lisääntymään ainoastaan elävässä solussa. Ne ovat kooltaan niin pieniä, ettei niitä voi erottaa valomikroskoopilla (Agrios 2005).

Virukset muodostuvat nukleiinihappomolekyylistä ja sitä suojaavasta proteiinivaipasta. Nukleiinihappomolekyyli voi olla joko yksi- tai kaksijuosteinen DNA- tai RNA-rihma. Joillakin viruksilla on useita erikokoisia nukleiinihappomolekyyliä ja useampia proteiineja kuorestaan. Viruspartikkeli voi sisältää myös entsyymejä ja membraanilipidejä. Viruksen kuoriosaa ja sen suojaamaa genomia yhdessä kutsutaan nukleokapsidiksi.

Viruspartikkeleita on erimallisia ja erikokoisia. Useimmat ovat pitkiä ja taipuisia kierteitä tai pallomaisia monikulmioita, mutta löytyy myös sauvamaisia tai sylinterimäisiä kasviviruksia.

Kasvivirukset on yleensä nimetty ensimmäisenä löydetyn isäntäkasvin ja aiheuttamiensa oireiden mukaan, kuten esimerkiksi vadelmanlehtilaikkuvirus (Raspberry leaf spot virus, RLSV). Ne jaetaan nukleiinihappokoostumuksensa mukaan RNA- ja DNA-viruksiin ja edelleen yksi- tai kaksi juosteisiin RNA- ja DNA-viruksiin.

Yksijuosteiset RNA-virukset jaetaan edelleen positiivi- ja negatiivisäikeisiin viruksiin. Positiivisäikeiset RNA-virukset toimivat kuin lähetti-RNA, eli ovat isäntäsoluun päästyään transloitavissa suoraan proteiineiksi. Negatiivisäikeisten RNA-virusten virionissa on mukana RNA-riippuvainen RNA-polymeraasi, jonka avulla virusgenomista syntetoidaan transkriptiossa lähetti-RNA. Translaatiossa tästä lähetti-RNA:sta rakennetaan proteiineja.

Kasvipatogeeniset virukset pääsevät isäntäkasviin haavasta, hyönteisvektorin avustuksella tai viroottisen siitepölyn kautta (Agrios 2005). Tunkeuduttuaan isäntäsoluun virushiukkanen purkautuu ja valjastaa solun kopioimaan virusta. Tämä kuluttaa solun energiavaroja ja aiheuttaa häiriöitä solun metabolisiin prosesseihin. Infektoituneen solun soluhengitys kiihtyy, ja fotosynteesi sekä kasvu hidastuvat. Elävät solut ovat viruksen elinehto, mutta kasvin puolustusjärjestelmä yleensä ohjelmoi

infektoituneet solut tuhoutumaan, jottei infektio pääsisi leviämään kasvissa.

Eri kasviviruksilla on erilaisia leviämisstrategioita isäntäkasvinsa sisällä. Toiset virukset levittäytyvät systeemisesti kasvin jokaiseen soluun, kun taas toiset muodostavat vain paikallisen infektion.

Systeemisessä infektiossa virus levittäytyy kasvin kaikkiin osiin kasvin johtosolukoita pitkin. Kasvavat, meristemaattiset, solukot ovat sairaassakin kasvissa yleensä virusvapaita, mihin perustuu mm. solukkoviljeltyjen taimien puhtaus.

Metsäekosysteemeissä virukset leviävät yleensä maaperässä sieni- tai nematodivektorin välityksellä, siemenen tai siitepölyn kautta tai jonkin puuta ravinnokseen käyttävän hyönteisvektorin avulla. On kuitenkin olemassa myös viruksia, jotka eivät tarvitse vektoria, vaan siirtyvät puuhun suoraan maasta tai vedestä jonkin vauriokohdan kautta. Virukset pääsevät siirtymään helposti puusta toiseen myös juuriyhteyksien kautta (Bremer 1991).

Virustaudin oireet ilmenevät kasvissa erilaisina kehityshäiriöinä, kääpiökasvuisuutena, epämuodostumina, erilaisina kloroottisina tai nekroottisina lehtilaukkuina, lehtien kirjavuutena, kurttuisuutena tai kierteisyytenä. Puilla virusinfektio voi aiheuttaa myös karkeakuorisuutta ja puuaineksen visautumista (Bremer 1991). Oireet voivat olla silmiinpistävät tai niitä voi olla vaikea havaita, mutta ne vähentävät lähes aina sadon määrää ja heikentävät sen laatua. Virus ei silti yleensä tapa kasvia kokonaan, sillä elävät solut ovat sen elinehto. Infektio voi olla myös latentti, jolloin kasvi on ulkoisesti täysin terveen näköinen.

2.2.1 Pihlajan virukset

Pihlaja kuuluu ruusukasvien (*Rosaceae*) heimoon, kuten monet muut suomalaisten pihojen puut, pensaat ja perennat. Tämän vuoksi niillä on myös yhteisiä tauteja ja tuholaisia. *Rosaceae*-heimoon kuuluvat esimerkiksi vatukat (*Rubus*), mansikat (*Fragaria*), omenapuut (*Malus*), luumut (*Prunus*), tuomet (*Prunus*), aroniat (*Aronia*) ja päärynät (*Pyrus*).

Pihlajan taloudellinen merkittävyys on ollut niin vähäinen, ettei sen tauteja ole kovin määrätietoisesti kartoitettu, mutta sen kestävyys tauteja ja tuholaisia vastaan tiedetään erittäin hyväksi. Pihlaja sietää myös hyvin latvuston ja juuriston tuhoja (Miller ym. 1982, Salminen 2014). Kuoren vaurioituessa se erittää nopeasti suojaavia aineita ja käynnistää vaurioituneiden solujen ohjatun solukuoleman eli apoptoosin (Woodward & Pocock 1996). Kuolleet solut puutuvat eli lignifikoituvat ja muodostavat eräänlaisen suoja-alueen (ligno-suberized barrier zone) vaurioituneiden ja terveiden solukoiden välille. Tämä suojaa puuta tehokkaasti infektoilta.

Kirsikan kierrelehtivirus, CLRV on maailmanlaajuisesti taloudellisesti merkittävä kasvivirus. Se raportoitiin ensimmäisen kerran jo vuonna 1933 saksanpähkinällä Pohjois-Amerikassa. Sillä on erittäin laaja isäntäkasvivalikoima ja monia eri kantoja. CLRV:n on raportoitu aiheuttaneen mittavia tuhoja mm. kirsikkaviljelmillä Englannissa ja Saksassa, vadelmaviljelyksillä Uudessa-Seelannissa, saksanpähkinäpuilla Unkarissa, pyökki- ja koivumetsissä Saksassa, oliiviviljelmillä Italiassa ja Espanjassa sekä suomalaisille kaupunkikoivuille (Büttner ym. 2011). Se on nykytietämyksen mukaan siemen- ja siitepölylevintäinen virus, joka on Suomessa raportoitu koivulla ja pihlajalla. EMARAV ja CLRV on myös löydetty pihlajasta sekainfektiona (Arndt 2009).

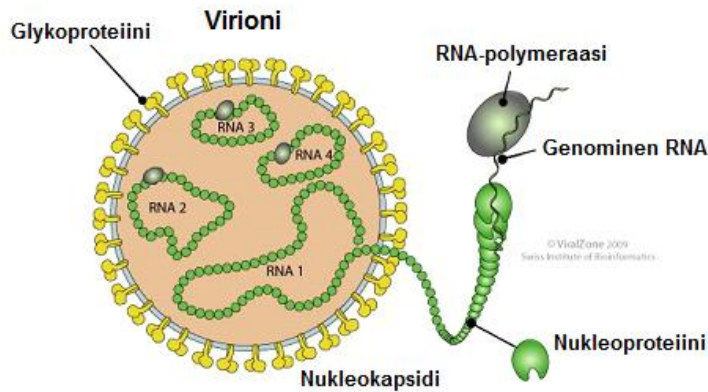
Joidenkin omenan virusten (ApMV, ACLSV) on todettu aiheuttavan oireita pihlajassa (Campbell & Sweet 1976, Castello & Nienhaus 1989, Polák & Zieglerová 1996). Myös tupakanmosaiikkiviruksen (TMV),

tupakanrengaslaikkuviruksen (TRSV) ja tomaatinrengaslaikkuviruksen (TmRSV) on todettu infektoivan pihlajia (*Sorbus ssp.*), haittavan niiden kasvua ja aiheuttavan niissä lehtilaikkuoireita (Hibben 1966, 1972, 1988, Agrios 1974).

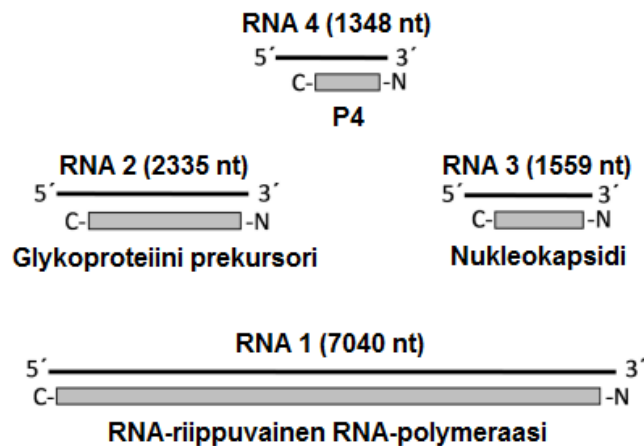
Pihlajanrengaslaikku on merkittävin ja laajalle levinnein pihlajalla raportoitu virustauti. Se aiheuttaa lehtiin renkaan muotoisia kloroottisia laikkuja ja esiintyy yleisesti Pohjois- ja Keski-Euroopassa.

2.2.2 Emaravirukset

Emaravirusten virionit ovat kaksoismembraanin ympäröimiä partikkeleita (kuva 1), ja virukset ovat ilmeisesti ainakin pääosin äkämäpunkkilevintäisiä (*Eriophyidae*-heimo) (Mielke-Ehret ja Mühlbach 2012). Genomi koostuu vähintään neljästä yksijuosteisesta negatiivisesta RNA-säikeestä (kuva 2). Pihlajanrengaslaikkuvirus, EMARAV, on *Emaravirus* -suvun tyyppilaji. Sukuun on ehdotettu kuuluvaksi kuusi muutakin luokittelematonta virusta: viikunanmosaiikkivirus (FMV, Elbeaino ym. 2009), ruusunruusukevirus (RRV, Laney ym. 2011), vadelmanlehtiläiskävirus (RLBV, McGavin ym. 2012), maissinpunajuovavirus (MRSV, Mielke-Ehret & Mühlbach 2012), kyyhkynherneensteriilimosaiikkivirus (PPSMV, Elbeaino ym. 2014) ja seittitakiaisenkeltasuonivirus (WBYVV, Bi ym. 2012). MRSV on sama virus kuin kirjallisuudessa mainitut high plains disease (HPD) ja vehnänmosaiikkivirus (WMOV).



Kuva 1. Pihlajanrengaslaikkuviruksen virioni. Virionia ympäröi kaksoismembraani johon on uponneena glykoproteiineja. Genomi koostuu neljästä yksijuosteisesta RNA-rihmasta. Nukleoproteiinit ovat yhteydessä viruksen nukleiinihappoihin ja osallistuvat niiden sekundaari- ja tertiäärirakenteen muodostumiseen. RNA-virukset tarvitsevat replikoituaakseen erityisen RNA-riippuvaisen RNA-polymeraasin, joka syntetisoi viruksen lähetti-RNA:n.
Lähde: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/771.html



Kuva 2. Emaravirusten genomi koostuu vähintään neljästä yksijuosteisesta negatiivisesta RNA-säikeestä. Mustat janat esittävät viruksen genomista RNA:ta, harmaat sen koodaamia proteiineja.
Lähde: Mielke-Ehret, N., Mühlbach, H-P. 2012. *Emaravirus*: A novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses* 2012, 4, 1515-1536.

2.2.3 Pihlajanrengaslaikkuvirus, EMARAV

Kloroottisista rengaslaikkuoireista ja kirjavuudesta pihlajan (*Sorbus aucuparia*) lehdissä (kuva 3) on raportoitu eri puolilla Eurooppaa jo 60- ja 70-luvuilla (Kegler 1960; Cooper 1979). E. A. Jamalainen raportoi näistä oireista suomalaisissa pihlajissa jo vuonna 1957 ja totesi oireet yleisiksi koko maassa. Keglerin (1960) mukaan rengaslaikkuoireet siirtyivät oksastuksessa, kun sairaasta pihlajasta siirrettiin silmuja terveeseen. Myöhemmin (1995) Führling ja Büttner tulivat samaan johtopäätökseen oksastuksen vaikutuksesta patogeenin leviämiseen pihlajassa.



Kuva 3. Rengaslaikkuoireita pihlajan lehdessä.

Kyseisiä oireita on arvailtu mm. omenanmosaiikkiviruksen aiheuttamiksi (Bremer 1991) ja niiden alkuperää on yritetty selvittää monin keinoin. Joidenkin omenan virusten onkin todettu aiheuttavan oireita pihlajassa (Campbell & Sweet 1976 ja Castello & Nienhaus 1989), mutta yhteyttä näihin luonnossa yleisenä esiintyviin oireisiin ei ole pystytty todentamaan.

Ebrahim-Nesbat ja Izadpanah (1992) löysivät elektronimikroskooppitutkimuksessaan pallon muotoisia partikkeleita rengaslaikkuisista ja kirjavista pihlajan lehdistä. Partikkeleiden halkaisija oli noin 80 nm. Nämä partikkelit muistuttivat erästä tomaatin virusta (TSWV), mutta TSWV-infektiota kyseisissä lehdistä ei pystytty todistamaan.

Ebrahim-Nesbatin ja Izadpanahin (1992) elektronimikroskooppilöydökset, tutkimukset oksastuksen vaikutuksesta infektion leviämiseen (Kegler 1960, Furling & Büttner 1995) ja ympäri Eurooppaa kuvatut tunnusomaiset oireet yhdessä osoittivat, että pihlajan rengaslaikkutauti on todennäköisimmin viruksen aiheuttama ja etenee kasvissa systeemisesti.

Tämä teoria sai vahvistusta Saksassa (Benthack ym. 2005), kun tunnusomaiset oireet omaavasta pihlajanlehtimateriaalista pystyttiin toistuvasti eristämään neljä erikokoista kaksijuosteista RNA-molekyyliä. Otaksuttua virusta ei pystytty kuitenkaan tunnistamaan. Kaksijuosteinen RNA (dsRNA) ei kuulu kasvisoluun ja on poikkeuksetta peräisin viruksesta (Valkonen & Jalkanen 2009). Se on RNA-viruksen perintöaineksen monistumisvaiheessa oleva muoto.

Tutkimus sai jatkoa (Mielke 2007), jossa aiemmin havaitut RNA-molekyylit sekvensoitiin. Vaikka sekvenssianalyseissä havaittiinkin yhtäläisyyksiä jo tunnettuihin viruksiin (*Bunyaviridae*), ei virusta edelleenkään pystytty tunnistamaan miksikään jo tunnetuksi virukseksi, vaan se nimettiin alustavasti EMARAV:ksi (European mountain ash ringspot-associated virus).

Saksalaisten julkaisemat virussekvenssit herättivät kiinnostuksen tutkia myös suomalaisia rengaslaikkuoireisia pihlajia. Professori Jari Valkonen organisoikin heti kesäkuussa 2007 ympäri Suomea ulottuvan pihlajanlehtimateriaalin keräyksen, jonka tarkoituksena oli kartoittaa suomalaisten pihlajien tilannetta julkaistujen virussekvenssien osalta. Tässä pro gradu –tutkielmassa on kysymys juuri kyseisestä (Kallinen ym. 2009) tutkimuksesta.

Vuonna 2010 Mielke-Ehret ryhmineen tutki rengaslaikkuoireisia pihlajia ja löysi niiden silmuista päärynänäkämäpункkeja, *Phytoptus pyri* Pagenstecher (= *Eriophyes pyri*). Tutkimusryhmä onnistui eristämään EMARAV-partikkelit sekä pihlajasta että punkista, ja ehdottivat kyseistä punkkilajia mahdolliseksi vektoriksi pihlajanrengaslaikkuvirukselle.

Aihetta on tutkittu edelleen, eikä virukselle ole löytynyt jo tunnettua virussukua. Niinpä Mielke-Ehret ja Mühlbach (2012) ehdottivat, että pihlajanrengaslaikkuvirus kuuluu uuteen *Emaravirus*-sukuun, johon on sittemmin ehdotettu kuuluvaksi myös muita aiemmin luokittelemattomia viruksia: viikunanmosaiikkivirus (FMV), ruusunruusukevirus (RRV), vadelmanlehtiläiskävirus (RLBV), maissinpunajuovavirus (MRSV), kyyhkynherneensteriilimosaiikkivirus (PPSMV) ja seittitakiaisenkeltasuonivirus (WBYVV). Näillä viruksilla on huomattavia yhteneväisyyksiä nukleiinihappokoostumuksessa, virionien rakenteessa ja vektorilajeissa.

EMARAV on Saksan ja Suomen lisäksi löydetty sittemmin myös Venäjältä (Valkonen & Rännäli 2010), Ruotsista (von Bargen ym. 2013), Skotlannista (Robel ym. 2013) ja Tšekistä (Grimová ym. 2014). Sekvenssianalyysit näiden maiden näytteistä osoittivat vaihtelun viruksen eri maiden eri isolaateissa olevan hyvin pientä. Joissakin tapauksissa alueellista vaihtelua on kuitenkin havaittavissa.

Vuonna 2014 tšekkiläinen tutkimusryhmä (Grimová ym.) onnistui siirtämään EMARAV:in infektoituneiden pihlajan silmujen mukana useisiin

muihin *Rosaceae* -heimon lajeihin (mm. omena ja päärynä) ja risteymiin. Osaan infektoiduista kasveista (*Sorbaroniat*, aroniat, tuomipihlajat ja pihlajat) kehittyi tyypilliset rengaslaikkuoireet.

Samassa tutkimuksessa kartoitettiin EMARAV-infektiot myös alueen villilajeista, jolloin kyseinen virus löydettiin ensi kertaa muistakin *Sorbus*- ja *Aronia*-sukujen (*S. aucuparia* subsp. *moravica*, *S. aucuparia* × *Crataegus sanguinea* cv. Granatnaja, (*Sorbus aria* × *Aronia arbutifolia*) × *S. aucuparia* cv. Burka, cv. Finskaja ja *Aronia melanocarpa*) lajeista ja lajiristeymistä. Sekvensoinnit ja fylogeneettiset analyysit luonnosta löydettyjen virusten nukleokapsidiproteiinia koodaavasta geenisekvenssistä osoittivat vaihtelun olevan vähäistä verrattaessa jo aiemmin löydettyihin EMARAV-sekvensseihin. Verrattaessa EMARAV-nukleokapsidiproteiinisekvenssiä myös muihin ehdotettuihin *Emaravirus*-lajeihin yhtäläisyyksien todettiin olevan ilmeisiä.

3 Tutkimuksen tavoitteet

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli jatkaa tutkimusta Mielken ja Mühlbachin (2007) artikkelin pohjalta Suomessa, ja ottaa selvää, löytyykö suomalaisista tunnusomaiset oireet omaavista ja oireettomista pihlajista Mielken ja Mühlbachin esittämää virussekvenssiä. Tavoitteena oli myös testata RT-PCR:ää ja dot blot –hybridisaatiota viruksen tunnistamisessa.

Hypoteesina oli, että rengaslaikkuoireisista pihlajista voidaan sekä RT-PCR:llä että dot blot –hybridisaatiolla tunnistaa saksalaisten esittelemä pihlajanrengaslaikkuviruksen virussekvenssi.

4 Tutkimusaineisto ja –menetelmät

4.1 Näytteet

Tunnusomaiset kloroottiset rengaslaikkuoireet omaavia sekä oireettomia pihlajan lehtiä kerättiin kesäkuussa 2007 eri puolilta Suomea ja Venäjältä Viipurin maalaiskunnasta (kuva 4). Pihlajanlehtinäytteiden määrä paikkakunnittain oli: Hamina, 5 kpl; Helsinki, 12 kpl; Joroinen, 1 kpl; Jyväskylä, 4 kpl; Jämsä, 2 kpl; Kuopio, 1 kpl; Leppävirta, 1 kpl; Mikkeli, 1 kpl; Pirkkala, 4 kpl; Ristiina, 14 kpl; Ruukki, 2 kpl; Siilinjärvi, 1 kpl; Sipoo, 2 kpl; Toijala, 2 kpl; Turku, 5 kpl; Vihti, 14 kpl ja Viipuri, 2 kpl.

Näytteiden keräys tapahtui ennen pihlajan kukintaa, sillä virusten määrä kasvissa laskee kasvin tullessa kukintavaiheeseen. Näytteitä kerättiin yhteensä 73 eri pihlajasta, joista 17 oli oireettomia. Lehtinäytteet pakastettiin tuoreina (viimeistään vuorokauden sisällä keräämisestä) ja säilytettiin muovipusseissa -20°C:ssa.



Kuva 4. Näytteiden keruupaikat Suomen kartalla (Kallinen ym. 2009).

4.2 RNA:n eristäminen

RNA:n eristyksessä ongelmaksi muodostuvat usein RNAasit, joita on käytännössä joka puolella. RNAasit hajottavat RNA:n nopeasti, jollei tuoreita näytteitä pakasteta nopeasti ja näytteiden hygieniasta huolehdita tarkasti kaikissa työvaiheissa. RNAasi-inhobiittoreiden käyttö on tarpeen. DEPC-käsittely inaktivoi RNAaseja tehokkaasti (Ollikka 2003).

Lehtinäytteet homogenoidaan nestetypessä, minkä jälkeen solut hajotetaan natriumlauryylisulfaatilla (SDS), joka on anioninen detergentti. SDS rikkoo proteiinien sekundaari- ja tertiäärirakenteen ja muuttaa aminohappoketjut lineaarisiksi.

RNA:n eristämisessä ns. kantaja-aineena voidaan käyttää hienojakoista lasijauhetta, silikaa, jonka pinnalle nukleiinihapot sitoutuvat. Silikapartikkeleiden käyttö auttaa pääsemään eroon varastoproteiineista ja muista sekundaarimetaboliiteista (Boom 1990). Linkoamisen jälkeen epäpuhtauksia sisältävä supernatantti kaadetaan pois, ja silikapellettiin sitoutuneet molekyylit suspensoidaan dH₂O:hon. Silikapartikkeleiden käyttö mahdollistaa puhtaamman RNA:n ja suuremman RNA-konsentraation.

Myös fenoli-kloroformi-uutto poistaa proteiineja. RNA saostetaan LiCl:lla. LiCl-saostus on selektiivinen, sillä DNA ei siinä saostu. Eristetyn RNA:n DNase-käsittely on tärkeä osa RNA:n eristystä, jotta viimeisetkin DNA-jäämät saadaan pois näytteestä (Ollikka 2003).

Eristettyjen RNA-näytteiden konsentraatio ja puhtaus voidaan mitata spektrofotometrillä kvartsikyveteissä. Spektrofotometrimittaus perustuu nukleotidien absorptioon 260 nm:ssa, jolloin puhdas RNA: $A_{260}/A_{280} = 2,0$ (Ollikka 2003).

4.2.1 Toteutus

RNA:n eristäminen toteutettiin pääosin Mielken ja Mühlbachin (2007) ohjeen mukaisesti, pienin muutoksin.

100 mg näytettä jauhettiin nestetypessä. Jauhettu näyte siirrettiin 2 ml:n eppendorf-putkeen ja siihen lisättiin 1 ml eristyspuskuria (4M guanidiinihydrokloridi; 0,2M natriumasetaatti pH 5,2; 1M kaliumasetaatti;

0,025mM etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA; Fluka, Buchs, Switzerland); 2,5% polyvinyylipyrrolidoni (PVP-40; Sigma, St Louis, MO, USA); huom. puskuria lämmitettävä liukenemisen helpottamiseksi) ja 200 µl 1% natriumlauryylisulfaattia (SDS).

Tämän jälkeen näyte ravistettiin ja inkuboitiin +70°C:ssa (10 min), välillä kevyesti sekoittaen. Inkuboinnin jälkeen näyte siirrettiin suoraan jäille (5 min) ja lingottiin (Eppendorf centrifuge 5415 R, 12 000 x g, +4°C, 10 min).

Linkoamisen jälkeen supernatantti jaettiin kahteen eppendorf-putkeen, kumpaankin 300 µl. Putkiin lisättiin 300 µl natriumjodidi-liuosta (6M natriumjodidi ja 0,15M natriumsulfiitti), 150 µl 99% EtOH:ia ja 30 µl silikasuspensiota (1 g/ml, pH 2), minkä jälkeen inkuboitiin 10 min huoneenlämmössä kevyesti ravistellen. Tämän jälkeen putket lingottiin (12 000 x g, 10 min) ja supernatantti pipetoitiin huolellisesti pois.

Silikapartikkelipelletit pestiin kahdesti TEN-puskurilla (10mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5mM EDTA; 50mM NaCl; 50% EtOH), kerran EtOH:lla (0,7 ml) ja lopuksi asetonilla (0,7 ml). Pesujen jälkeen pelletit kuivattiin 10 min +56°C:ssa kannet auki. Kuivuneet pelletit suspensoitiin 200 µl:aan dH₂O:ta ja lämpökäsiteltiin 5 min +70°C:ssa.

Tämän jälkeen näytteet lingottiin +4 °C:ssa (12 000 x g, 5 min), supernatantit siirrettiin uuteen putkeen ja uutettiin fenoli-kloroformi-IAA:lla (25:24:1, 1 vol.) kaksi kertaa (tai kunnes puhdas) lingoten uuttojen välissä (12 000 x g, +4°C, 5 min). Uuttojen jälkeen näytteeseen pipetoitiin kylmää (-20 °C) 99% EtOH:ia (1 vol.) ja 150 µl:aa LiCl:a (8M) ja jätettiin saostumaan -20°C:een yli yön.

Seuraavana päivänä näytteet lingottiin (12 000 x g, +4°C, 20 min) ja supernatantti pipetoitiin varoen pois. Pelletti pestiin 1 ml:lla kylmää 70% EtOH:ia, lingottiin (12 000 x g, +4°C, 5min), ja EtOH kaadettiin varovasti pois. Pelletin annettiin kuivua, kunnes se muuttui läpikuultavaksi, minkä jälkeen se liuotettiin 70 µl:aan dH₂O:ta ja lämmitettiin 5 min +60°C:ssa.

Näytteiden RNA-pitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä (Gene Quant 1300, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK) 1:100 laimennoksesta, ja eristetyt RNA:t pakastettiin (-20°C) myöhempää käyttöä varten.

4.3 RT-PCR

Polymeraasiketjureaktio (PCR) on hyvä ja nopea menetelmä kasvipatogeenin tunnistamiseen DNA-näytteestä, jos havainnoitavan patogeenin perintöaineksen sekvenssi, tai osia siitä, tunnetaan. Kun alukkeet suunnitellaan siten, että PCR-tuote on ominainen vain kyseiselle eliölle, tuotteen syntyminen osoittaa patogeenin läsnäolon näytteessä melko kiistattomasti (Ollikka 2003).

Jotta RNA:ta voidaan monistaa PCR:n avulla, se täytyy ensin kääntää DNA:ksi (cDNA) käänteiskopioijaentsyymien avulla. Tästä tulee nimitys reverse transcriptase –PCR, RT-PCR.

PCR:n eli polymeraasiketjureaktion periaate:

Tietty jakso DNA:ta monistuu, kun suunnitellaan sen kumpaankin juosteeseen spesifisesti sitoutuva aluke. Alukkeet sitoutuvat vastinjuosteiden vastakkaisiin päihin, jolloin niiden väliin jäävä DNA-jakso monistuu (Ollikka 2003). Reaktioon tarvitaan siis tutkittavan kohde-eliön, tässä tapauksessa viruksen, perintöainesta (RNA -> cDNA), kuumuutta kestävää polymeraasientsyymiä, alukkeita, nukleotideja, reaktiopuskuria ja ioneja.

Ensimmäinen aluke sitoutuu tutkitun DNA:n toisen juosteen alkupäähän ja toinen sille komplementaarisen juosteen loppupäähän. Entsyymi aloittaa monistamisen alukkeista ns. vastakkaisiin suuntiin, jolloin syntyy uudet,

toisilleen komplementaariset juosteet, jotka ovat identtisiä tutkitun DNA:n kanssa. Uudet juosteet irtoavat mallijuosteista lämpötilaa nostamalla, alukkeet sitoutuvat taas kohde-DNA:han ja uusi reaktiosykli alkaa.

PCR-reaktiot tehdään erityisessä PCR-laitteessa (Eppendorf Mastercycler), joka säätelee reaktioputkien lämpötilaa erittäin tarkasti ja halutun kaavan mukaan. Reaktiosykli koostuu denaturoinnista, jossa templaatti-DNA:n juosteet irtoavat toisistaan, annealingista, jossa alukkeet kiinnittyvät templaatteihin ja pidennyksestä, jossa DNA-polymeraasientsyymi liittää nukleotideja alukkeen 3'-päähän. Syklejä voi olla kymmeniä peräkkäin, jolloin templaatti-DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti (Ollikka 2003).

4.3.1 Toteutus:

Eristetyille totaali-RNA:ille tehtiin DNAasi-käsittely ennen cDNA:n valmistamista random hexamer –alukkeilla ja käänteiskopioijaentsyymillä (M-MLV RT), valmistajan (Promega, Madison, WI, USA) ohjeiden mukaisesti. cDNA- synteisiin käytettiin 1 µg totaali-RNA:ta.

cDNA:ille suunniteltiin PCR-alukkeet (NC525F & NC908R ja NC30F & NC1190R) PRIMER3-ohjelmalla geenipankista löytyvän EMARAV:in nukleokapsidiproteiinia koodaavaa RNA-sekvenssiä (GenBank, DQ831831) vastaavan DNA-sekvenssin pohjalta. Ensimmäinen alukepari tuottaa 383 nukleotidia pitkän tuotteen ja toinen 1160 nukleotidia pitkän tuotteen.

Tehtiin 20 µl:n PCR-reaktio, joka sisälsi 2,5 µl cDNA:ta, 4 µl puskuria (5x Phusion HF buffer), 0,4 µl dNTP:tä (10 mM), 0,5 µl 20 µM alukkeita, 0,2 µl DNA-polymeraasia (Phusion HF DNA polymerase; Finnzymes, Espoo, Finland) ja dH₂O:ta.

PCR-reaktion kulku:

1. +95°C, 1 min
2. +95°C, 10 s
3. +59°C, 30 s
4. +72°C, 30 s
5. +72°C, 5 min

Vaiheet 2-4 toistettiin 40 kertaa. Lopuksi reaktiot lopetettiin jäähdyttämällä +4°C:een.

Negatiivisina kontrolleina toimivat templaatti ilman alukkeita ja alukkeet ilman templaattia. Positiivista kontrollia varten suunniteltiin alukkeet geenipankista löytyvälle pihlajan alfa-tubuliini-mRNA-sekvenssille. Tämä geeni ilmentyy kasvilla kaiken aikaa ja pitäisi olla monistettavissa kaikista näytteistä. Positiivisena kontrollina alfa-tubuliini-mRNA-alukkeille toimi lehtinäytteestä 34 eristetty DNA.

PCR-tuotteet tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla (1% agarosigeeli, ethidiumbromidi 0,1 µg / ml). Markkerina toimi Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany).

4.4 RNA-koettimen valmistaminen

Lyhyemmästä (383 nukleotidia) PCR-tuotteesta valmistetaan RNA-koetin dot blot -hybridisaatiota varten. Koettimen valmistuksessa digoksigeniini (DIG) –leimattuja urasiili-nukleotidejä liitetään RNA-koettimeen in vitro transkriptiossa T7 RNA –polymeraasin avulla.

Nukleokapsidisekvenssin perusteella valmistettu (alukkeet NC525F ja NC908R) 383 nukleotidia pitkä PCR-tuote liitetään pGEM®-T-vektoriplasmidiin (ligaatio) ja kloonataan (transformaatio) *Escherichia coli*:in (kanta DH5 α). Plasmidi puhdistetaan GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) –kitillä ja sekvensoidaan. Plasmidi leikataan digestiossa sopivalla restriktioentsyymillä. RNA-koetin valmistetaan ja leimataan digoksigeniinillä in vitro transkriptiossa, jossa plasmidiin vietyä sekvenssiä tuotetaan leimatuista nukleotideista T7 RNA –polymeraasin avulla valmistajan (Promega, Madison, WI, USA) ohjeiden mukaisesti.

4.4.1 Toteutus

Alukeparilla NC525F ja NC908R valmistettu 383 nukleotidin mittainen PCR-tuote (lehtinäytteestä 62) ajettiin agarosigeelielektroforeesilla ja puhdistettiin geeliltä Gel Extraction Kit:illä. DNA-pitoisuus mitattiin spektrofotometrillä (konsentraatio 0,035 mikrogrammaa/mikrolitra, puhtaus $A_{260}/A_{280}=1,000$). Puhtaan DNA:n $A_{260}/A_{280} = 1,800$ (Ollikka 2003).

4.4.2 Ligaatio

Ligaatioon otettiin noin 53 nanogrammaa (1,5 μ l) 0,4 kb:n kokoista PCR-tuotetta (insertti) ja 50 nanogrammaa (1 μ l) 3 kb:n kokoista pGEM®-T-vektoria (insertti:vektori –suhde 8:1). Tarvittava insertin määrä laskettiin kaavalla:

$$\frac{50 \text{ ng vektoria} \times 0.4 \text{ kb insertti}}{3.0 \text{ kb vektori}} \times \frac{8}{1} = 53 \text{ ng inserttiä}$$

Tehtiin kolme 10 µl:n reaktiota: yksi koettimen valmistamista varten ja kaksi kontrollireaktiota.

Varsinaiseen reaktioon pipetoitiin 5 µl T4 DNA –ligaatiopuskuria (Promega), 50 ng (1 µl) lineaarista pGEM®-T-vektoria (Promega), 1,5 µl inserttiä (PCR-tuote), 1 µl T4 DNA –ligaasia (Promega) ja 1,5 µl H₂O:ta.

Positiiviseen kontrolliin pipetoitiin 5 µl T4 DNA –ligaatiopuskuria, 50 ng (1 µl) lineaarista pGEM®-T-vektoria, 2 µl kontrolli-insertti-DNA:ta (Promega), 1 µl T4 DNA –ligaasia ja 1 µl dH₂O:ta.

Taustakontrolliin pipetoitiin 5 µl T4 DNA –ligaatiopuskuria, 50 ng (1 µl) lineaarista pGEM®-T-vektoria, 1 µl T4 DNA –ligaasia ja 3 µl dH₂O:ta.

Reaktioita inkuboitiin huoneenlämmössä 1 h.

4.4.3 Transformaatio

Valmistettiin LB (Luria broth) –ampisilliinimaljoja, kaksi jokaista ligaatiota varten ja kaksi transformaatiokontrollia varten: sekoitettiin 12,5 g LB, 7,5 g agar ja 500ml H₂O ja autoklavoitiin. Kun seos oli jäähtynyt huoneenlämpöiseksi, siihen lisättiin 500 µl ampisilliinia (stokki 100 mg/ml) ja se jaettiin maljoille. Maljat siirrettiin +4 °C:seen jähmettymään.

Ligaatioreaktioputket lingottiin ja jokaisesta siirrettiin 5 µl puhtaaseen 1,5 ml:n eppendorf-putkeen jälle. Lisäksi jälle otettiin vielä yksi eppendorf-putki, johon pipetoitiin 0,1 ng avaamatonta vektoria transformaatiokontrolliksi.

Pakkasesta (-80°C) otettiin jälle sulamaan putki kompetentteja soluja (DH5α), joita sekoiteltiin varovasti kääntelemällä. Kun solut olivat sulia,

soluja pipetoitiin 50 µl jokaiseen jäällä olevaan eppendorf-putkeen (ligaatiot ja transformaatiokontrolli), käännettiin varovasti ja pidettiin jäällä 20 min.

Sen jälkeen soluille annettiin lämpöshokki, eli ne siirrettiin 45-50 sekunniksi vesihauteeseen (+42°C) ja sieltä heti takaisin jäälle kahdeksi minuutiksi. Lämpöshokin aikana plasmidi-DNA siirtyy bakteerisoluihin.

Putkiin lisättiin 950 µl huoneenlämpöistä kasvatusliuosta (LB-medium) ja inkuboitiin 1,5 h +37°C ravistellen (150 rpm).

Ennen maljausta LB-ampisilliinimaljoille lisättiin 50 µl IPTG:tä (100mM) ja 10 µl X-Gal:ia (50 mg/ml), jotka mahdollistavat pesäkkeiden sini-valko-selektion, ja annettiin imeytyä noin 30 min.

Transformaatiokontrolli laimennettiin 1:10 LB-mediumiin ennen maljausta, minkä jälkeen jokaisesta transformaatiosta maljattiin 100 µl maljoille ja loput solut lingottiin putkien pohjalle (1000 x g, 10 min). Syntyneet pelletit resuspensoitiin 200 µl:aan LB-mediumia ja maljattiin resuspensiosta 100 µl toisille maljoille. Maljat pidettiin yön yli (16-24 h) +37°C:n lämpötilassa.

Tavoitteena oli, että maljalla näkyisi noin 100 pesäkettä (sinisiä ja valkoisia) ja valkoisissa pesäkkeissä olisi insertti (sini-valko-selektio). Maljat säilytettiin myöhempää tarkastelua varten (+4°C).

4.4.4 Minilysaatti-kasvatus plasmidi-DNA:n eristykseen

Kloonausmaljoilta valittiin valkoisia pesäkkeitä nesteviljelyyn 2 kpl / klooni. Jokainen viljelyyn valittu pesäke siirrostettiin 5 ml:aan kasvatusliuosta [1 x LB + ampisilliini (100 µg/ml)]. Soluja kasvatettiin yön yli +37°C:ssa ravistellen.

4.4.5 Plasmidi-DNA:n eristys (Zhou ym. 1990) ja sekvensointi

Yön yli kasvaneista viljelmistä pipetoitiin 1,5 ml puhtaisiin Eppendorf-putkiin ja lingottiin 1 min (15682 x g).

Supernatantti kaadettiin pois ja putkiin lisättiin 300 µl TENS –puskuriliuosta (10M NaOH, 10% SDS, 1M Tris (pH 8), 0,5M EDTA). Putket ravistettiin nopeasti. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 200 µl natriumasetaattia (3M; pH 5,2), ravistettiin lyhyesti ja lingottiin 4 min (15682 x g).

Linkoamisen jälkeen supernatantit siirrettiin uusiin putkiin, lisättiin 900 µl 99% EtOH:ia, sekoitettiin ja annettiin saostua huoneenlämmössä 10 min.

Plasmidit lingottiin pelletiksi, supernatantti poistettiin, ja pelletti huuhdeltiin kylmällä 70% EtOH:lla ja annettiin kuivua. Lopuksi pelletit liuotettiin 30 µl:aan dH₂O:ta.

Eristettyjen plasmidi-DNA:iden konsentraatiot mitattiin spektrofotometrillä, ja näytteistä tehtiin mitattujen DNA-pitoisuuksien mukaiset laimennokset sekvensointia varten siten, että sekvensointiin lähetettiin 11 µl näytteet joiden DNA-pitoisuudet vaihtelivat 45-68 ng:n välillä / µl. Mukaan pakattiin myös sekvensointialukkeet M13F ja M13R (Promega, Madison, WI, USA), 5 pmol / reaktio.

4.4.6 Plasmidi-DNA:n digestio koettimen valmistusta varten

Sekvenssejä verrattiin Contig Express –ohjelmalla pihlajanrengaslaikkuviruksen ”putative nucleocapsid protein mRNA” –sekvenssiin (GenBank, DQ831831). Restriktioentsyymi valittiin Nebcutter-ohjelmalla (www.neb.com) siten, että se ei leikkaa inserttiä, leikkaa

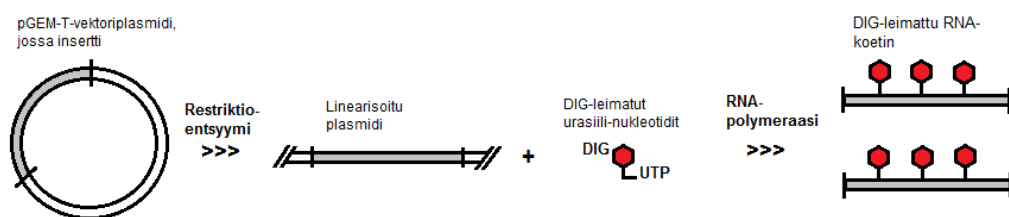
plasmidin vain yhdestä kohtaa ja jättää 5'-hännän DIG-leimausta varten. Valittiin restriktioentsyymiksi *Bsal* (New England BioLabs).

50 µl:n restriktioreaktioon pipetoitiin 1 µl *Bsal*-restriktioentsyymiä, 1 µg (2,9 µl) plasmidi-DNA:ta, 5 µl 10x Nebuffer 3 [1x Nebuffer 3: 100mM natriumkloridi (NaCl), 50mM Tris-HCL, 10mM magnesiumkloridi (MgCl₂), 1mM ditiotreitoli (DTT), pH 7,9 @ 25°C], 1 µl BSA (bovine serum albumin, New England BioLabs) ja 40,1 µl dH₂O.

Restriktioreaktiota digestoitiin tunti 37°C:ssa. Reaktio pysäytettiin 65°C:ssa (20 min, heat inactivation). Linearisoidut plasmidi-DNA:t säilytettiin -20 °C:ssa.

4.4.7 DIG-RNA-leimaus

Linearisoidusta plasmidi-DNA:sta valmistettiin RNA-koetin RNA-polymeraasin avulla (DIG RNA Labeling Mix, 10x conc., Roche).



Kuva 5. DIG-leimatun RNA-koettimen valmistaminen.

Lähde: Roche, RNA labeling guide,

<http://lifescience.roche.com/shop/CategoryDisplay?brandOverview=1&identifier=Labeling+and+Detection+Overview>

Koska restriktioreaktion tilavuus oli 50 µl (1 µg DNA / 50 µl), siitä jouduttiin haihduttamaan vettä pyöröhaihduttimessa (speed vacuum). Haihdutuksen jälkeen lopputilavuudeksi saatiin 10 µl.

Leimausreaktio (yht. 20 µl): 10 µl (1 µg) linearisoitua plasmidi-DNA:ta, 2 µl 10x DIG RNA Labeling Mix (Roche), 4 µl 5x Transkription buffer (Roche), 2 µl DTT (ditiotreitoli) ja 2 µl T7 RNA polymerase (18U / µl).

Reaktiot sekoitettiin, lingottiin ja inkuboitiin kaksi tuntia (+37°C). Inkuboinnin jälkeen reaktiot pysäytettiin lisäämällä 2 µl 0,2M etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA, pH 8,0).

4.4.8 Koettimen leimauksen tarkistus

Ennen varsinaista käyttöä koettimen leimaus tarkistettiin, jotta sen konsentraatio voitiin optimoida.

Saadun leimatun RNA:n määräksi oletettiin 1 µg / µl, ja siitä tehtiin DIG-leimattua kontrolli-RNA:ta (DIG-labeled Control RNA, Roche, 0,1 µg / µl) vastaavat laimennokset:

1: 1 000 (100 pg / µl)

1: 10 000 (10 pg / µl)

1: 30 000 (3 pg / µl)

1: 100 000 (1 pg / µl)

1: 300 000 (0,3 pg / µl)

1: 1 000 000 (0,1 pg / µl)

Suluissa DIG-leimatun kontrolli-RNA:n pitoisuudet laimennoksissa.

Standardit ja koetin-RNA:t pipetoitiin nylon-membraanille (Positively charged nylon membrane, Roche) ja annettiin kuivua. RNA:t kiinnitettiin membraanille UV-pöydällä 1 min / puoli.

Membraani laitettiin astiaan ja se kosteutettiin pesupuskurilla (taulukko 1). Pesupuskuri kaadettiin pois ja membraani peitettiin blokkauspuskurilla. Membraania inkuboitiin blokkauspuskurissa 30 min heilutellen.

DIG-vasta-aine (+4°C) lingottiin putken pohjalle (9279 x g, 5 min, +4°C) ja sekoitettiin blokkauspuskuriin suhteessa 1:10 000 (50 ml puskuria ja 5 µl antibodya).

Membraanilla oleva blokkauspuskuri kaadettiin pois ja tilalle vaihdettiin DIG-vasta-aine-blokkauspuskuri. Membraania inkuboitiin heilutellen 30 min.

Blokkauspuskurin tarkoitus on estää vasta-aineen epäspesifistä sitoutumista membraaniin. Myös liian suuri määrä vasta-ainetta aiheuttaa epäspesifistä sitoutumista ja suurentaa taustaa.

Inkuboinnin jälkeen membraani pestiin pesupuskurilla 2 x 15 min, minkä jälkeen astiaan lisättiin detektiopuskuri, ja membraania inkuboitiin 5 min.

Membraani siirrettiin muovitaskuun ja sen pinta kosteutettiin kemiluminesenssireagenssilla CDP-star (Roche, 500 µl / pieni membraani). Muovitasku suljettiin, ja membraani kuvattiin filmille pimeähuoneessa. Valotusaika oli noin 30 min.

Koska kontrolli-RNA:n konsentraatiot tiedettiin, koettimen ja kontrolli-RNA:n täpliä vertailemalla voitiin päätellä valmistetun RNA-koettimen konsentraatio. Koettimen ensimmäinen laimennos (1: 1000) vastasi kontrollin pitoisuutta 10 pg / µl, joten valmistetun RNA-koettimen pitoisuus on noin $1000 \times 10 \text{ pg} / \mu\text{l} = 10 \text{ ng} / \mu\text{l}$.

Taulukko 1. Koettimen leimauksen tarkistuksessa ja dot blot –hybridisaatiossa käytetyt puskuriliuokset.

DIG-puskurit:	
Puskuri 1:	
Maleiinihappopuskuri	2000 ml
0,1 M Maleiinihappo (M= 116,08 g / mol)	23,22 g
0,15 M NaCl (M= 58,44 g / mol)	17,53 g
Säädä pH 7,5 kiinteällä NaOH:lla	
Blokkauspuskuri:	
900 ml Puskuri 1	
100 ml 10x Blokkauksiliuos (Roche)	
Pesupuskuri:	
1000 ml Puskuri 1	
3 ml Tween	
Detektiopuskuri (pH 9,5):	
	500 ml
0,1 M Tris (M= 121,14 g / mol)	6,06 g
0,1 M NaCl (M= 58,44 g / mol)	2,92 g
20 x SSC	
	500 ml
3 M NaCl	87,66 g
0,3 M Natriumsitraatti (M= 294,1 g / mol)	44,12 g

4.5 Dot blot -hybridisaatio

Dot blot –hybridisaatio perustuu kahden yksijuosteisen nukleotidinauhan pariutumiseen, kun toinen nauhoista on etsitty sekvenssi ja toinen juuri tämän sekvenssin mukaan suunniteltu koetin. Koetin leimataan jollakin havaittavalla tavalla, tässä tapauksessa digoksigeniinillä (DIG).

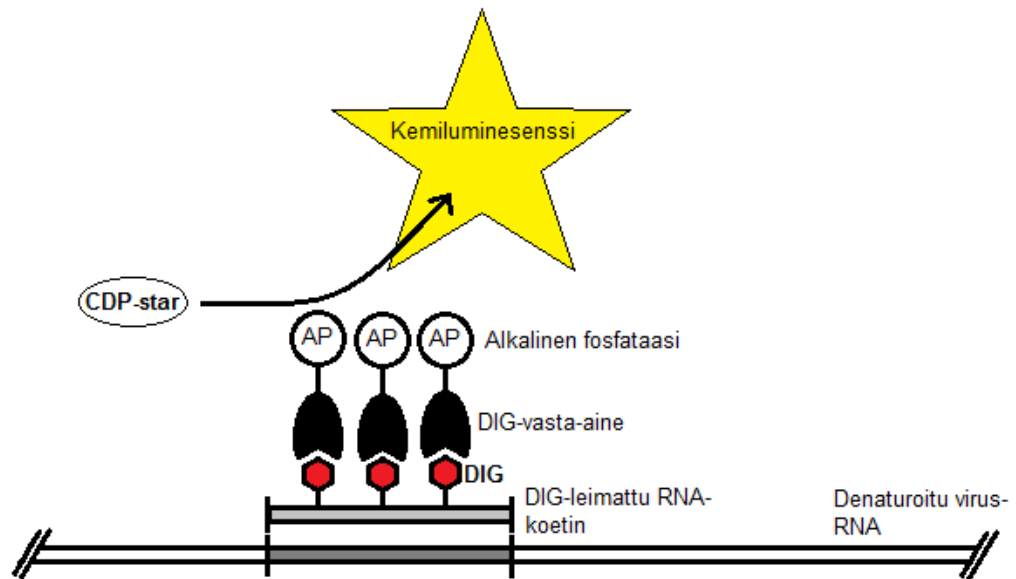
Dot blot –hybridisaatiossa denaturoidut RNA-näytteet pipetoidaan nylon-membraanille täpliksi ja kiinnitetään membraaniin UV-valolla. Tämän jälkeen suoritetaan esihybridisaatio, joka ehkäisee koettimen sitoutumista membraanin tyhjiin kohtiin. Esihybridisaatiossa käytettävä natriumkloridi-

natriumsitraatti (SSC) myös vahvistaa koettimen sitoutumista kohde-RNA:han.

Esihybridisaation jälkeen membraania hybridisoidaan liuoksella, jossa on DIG-leimattua RNA-koetinta. Virussekvenssin mukaan valmistettu koetin sitoutuu näytteisiin, joissa on sille komplementaarista RNA:ta, eli viruksen perintöainesta.

Ylimääräinen koetinliuos pestään pois, ja membraani blokataan blokkaustrupurilla epäspesifisen sitoutumisen minimoimiseksi. Blokkauksen jälkeen membraani käsitellään DIG-vasta-aineella, joka sitoutuu koettimen digoksigeniiniin. DIG-vasta-aine on konjugoitu alkalisella fosfataasientsyymillä, joka katalysoi monenlaisten proteiinien ja nukleiinihappojen defosforylaatiota.

Membraani pestään ja käsitellään kemiluminesenssiagenssi CDP-starilla (Roche), joka toimii DIG-vasta-aineeseen konjugoituneen alkalisen fosfataasin substraattina. Entsyymien katalysoima fosfaattiryhmän poisto (defosforylaatio) tuottaa valoa (kemiluminesenssi) (kuva 6). Fosfataasiaktiivisuus voidaan havaita mustina täplinä kehittämällä filmi membraanin päällä pimeähuoneessa.



Kuva 6. Hybridisaatio ja detektio. DIG-leimattu RNA-koetin sitoutuu sille komplementaariseen virus-RNA:han. DIG-vasta-aine, johon on liitettyä alkalinen fosfataasientsyymi, sitoutuu DIG-leimattuun koettiin. Alkalinen fosfataasientsyymi katalysoi CDP-starin defosforylaation, joka voidaan havaita kemiluminesenssina.

4.5.1 Toteutus

Dot blot –hybridisaatio aloitettiin totaali-RNA-näytteiden denaturoinnilla (+95°C 10min), jonka jälkeen näytteet siirrettiin jälle. Positiivisina detektiokontrolleina toimivat DIG-leimattu RNA-koetin ja DIG-leimattu kontrolli-RNA (DIG-labeled Control RNA, Roche). Positiiviseksi kontrolliksi otettiin myös RT-PCR-tuote näytteestä numero 9, koska se sisältää koettimelle komplementaarisen sekvenssin. Negatiivisina kontrolleina toimivat dH₂O ja plasmidi-DNA, johon oli liitettyä 223 nukleotidin mittainen pätkä pihlajan alfa-tubuliini-mRNA-sekvenssiä.

Näytteet pipetoitiin yksitellen membraanille (Positively charged nylon membrane, Roche, 5 µl / näyte) tarkkaan merkittyyn kohtaan ja kiinnitettiin membraanille UV-pöydällä (1 min / puoli). Membraanista leikattiin yksi

kulma pois, jotta myöhemmin olisi helpompi tietää, millä puolella membraania näytteet ovat.

Esihybridisaatio aloitettiin kostuttamalla mebraani 2X SSC –puskurilla (20X SSC: 3M natriumkloridi; 0,3M natriumsitraatti). Tämän jälkeen membraani laitettiin hybridisaatioputkeen, johon lisättiin 15 ml esilämmitettyä (+68°C) DIG easy hyb Granules –liuosta (Roche) ja hybridisotiin +68°C 1 h.

Hybridisaatio aloitettiin vaihtamalla putkeen uusi esilämmitetty (+68°C) hybridisaatioliuos (5 ml), johon oli lisätty RNA-koetinta (10 ng / µl) 30 µl. Membraania hybridisoitiin (+68°C) yli yön.

Seuraavana päivänä hybridisaatio/koetin –liuos kaadettiin varoen pois hybridisaatioputkesta ja laitettiin talteen myöhempää käyttöä varten. Membraania pestiin huoneenlämmössä ensin vahvemmallalla SSC-liuoksella (2X SSC; 0,1% SDS) kaksi kertaa 5 min ja sitten +70°C:ssa laimeammalla SSC-liuoksella (0,1X SSC; 0,1% SDS) kaksi kertaa 15 min (liuos esilämmitetty +70°C).

Pesujen jälkeen membraani laitettiin astiaan ja kostutettiin pesupuskurilla. Pesupuskuri kaadettiin pois ja astiaan lisättiin blokkauspuskuri niin että membraani peittyi. Membraania inkuboitiin blokkauspuskurissa heilutellen 30 min.

Blokkauksen jälkeen DIG-vasta-aine lingottiin putken pohjalle (9279 x g, 5 min, +4 °C) ja sekoitettiin blokkauspuskuriin suhteessa 1:20 000 (100 ml puskuria + 5 µl vasta-ainetta). Membraanilla oleva blokkauspuskuri kaadettiin pois ja vaihdettiin tilalle vasta-aine-blokkauksuspuskuri. Membraania inkuboitiin heilutellen 30 min.

Inkuboinnin jälkeen membraani pestiin pesupuskurilla 2 x 15 min, minkä jälkeen lisättiin detektiopuskuri, ja membraania inkuboitiin 5 min heilutellen. Membraani siirrettiin muovitaskuun ja sen pinta kostutettiin kemiluminesenssireagenssilla CDP-star (Roche, n. 500 µl / pieni

membraani). Muovitasku suljettiin, ja membraani kuvattiin filmille pimeähuoneessa. Valotusaika oli noin 30 min.

Tutkimusaineisto kerättiin kesäkuussa 2007. RNA:n eristykset suoritettiin talvella 2007/2008. Näytteiden dot blot –hybridisaatio tehtiin keväällä 2008.

Kaikissa työvaiheissa käytetty dH₂O oli DEPC-käsiteltyä.

5 Tulokset

Lehtinäytteitä oli yhteensä 73 kpl, joista 17 oli kerätty oireettomista, terveen näköisistä puista (taulukko 2). Oireellisissa lehtinäytteissä oli hyvin selvästi havaittavissa kloroottisia rengaslaikkuja ja/tai kloroottista kirjavuutta. Joissakin näytteissä oli havaittavissa myös pieniä nekroottisia laikkuja. Oireettomat näytteet olivat täysin terveen näköisiä ja väriltään tasaisia.

Taulukko 2. Tulokset näytteittäin [oireettomat näytteet (-), oireelliset näytteet (+), näytteestä saatu positiivinen tulos RT-PCR:ssä ja/tai hybridisaatiossa (X)].

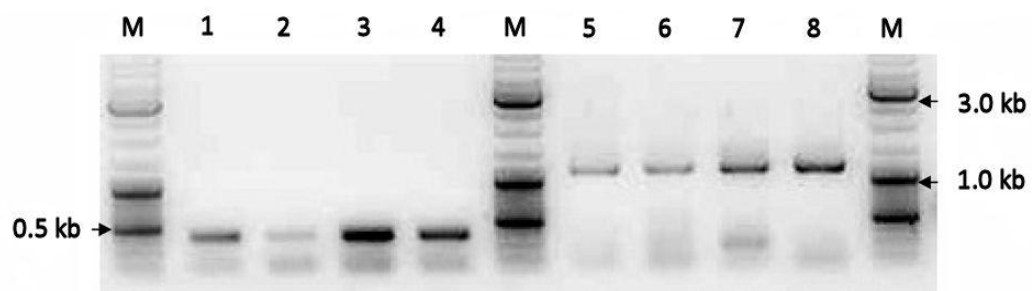
Pihlajanlehtinäytteet				RNA:n eristys		RT-PCR		Dot blot-hybridisaatio
Näyte	Keräyspaikka	Pvm	Oireet +/-	Pitoisuus µg/µl	Puhtaus A260/A280	Tuote 1160 nt	Tuote 383 nt	
1.	Vihti kk.	10.6.2007	+	0,248	1,44		X	X
2.	Vihti kk.	10.6.2007	+	0,112	1,4	X	X	X
3.	Vihti kk.	10.6.2007	+	0,244	1,42	X	X	X
4.	Jyväskylä	10.6.2007	+	0,236	1,48		X	X
5.	Jyväskylä	10.6.2007	+	0,516	1,55		X	X
6.	Jyväskylä	10.6.2007	+	0,276	1,5			X
7.	Jyväskylä	10.6.2007	+	0,48	1,54	X	X	X
8.	Jämsä	10.6.2007	+	0,248	1,48	X		X
9.	Jämsä	10.6.2007	+	0,512	1,49	X	X	X
10.	Toijala	10.6.2007	+	0,316	1,41			X
11.	Toijala	10.6.2007	+	0,224	1,37	X	X	X
12.	Kuopio	12.6.2007	+	0,456	1,48	X	X	X
13.	Hamina	17.6.2007	+	0,172	1,19			X
14.	Hamina	17.6.2007	+	0,18	1,29			X
15.	Vihti, Ojakkala	18.6.2007	+	0,312	1,39			X
16.	Vihti, Ojakkala	18.6.2007	+	0,152	1,46	X		X
17.	Vihti kk.	19.6.2007	+	0,308	1,35			X
18.	Vihti kk.	19.6.2007	+	0,16	1,33	X		X
19.	Viipurin mlk.	19.6.2007	+	0,2	1,43	X		X
20.	Viipurin mlk.	19.6.2007	+	0,484	1,26			X
21.	Siilinjärvi, Vuorela	12.6.2007	-	0,184	1,48			X
22.	Leppävirta	12.6.2007	-	0,372	1,4		X	X
23.	Joroinen	12.6.2007	-	0,278	1,23			X
24.	Mikkeli	12.6.2007	-	0,324	1,43			X
25.	Vihti, Herrakunta	17.6.2007	-	0,232	1,49			X
26.	Hamina, Husula	17.6.2007	-	0,292	1,26			X
27.	Hamina, Vilniemi	17.6.2007	-	0,248	1,26			X
28.	Hamina, Ristiniemi	17.6.2007	-	0,164	1,41			X
29.	Vihti, Ojakkala	21.6.2007	-	0,14	1,46			X
30.	Vihti, Moksi	21.6.2007	-	0,14	1,46			X
31.	Vihti, Moksi	21.6.2007	-	0,18	1,5			X
32.	Vihti, Moksi	21.6.2007	-	0,176	1,8			X
33.	Vihti, Moksi	21.6.2007	-	0,408	1,6			X
34.	Vihti, Moksi	21.6.2007	-	0,236	1,6			X
35.	Helsinki, Roihuvuori	3.6.2007	+	0,652	1,41	X	X	X
36.	Helsinki, Roihuvuori	3.6.2007	+	0,64	1,51			X
37.	Helsinki, Roihuvuori	3.6.2007	-	0,252	1,5	X		X
38.	Helsinki, Roihuvuori	4.6.2007	+	0,996	1,57	X		X

39.	Helsinki, Roihuvuori	4.6.2007	+	1,32	1,56	X		X
40.	Helsinki, Siilitie	4.6.2007	+	1,028	1,55	X		X
41.	Helsinki, Siilitie	4.6.2007	+	0,332	1,51	X		X
42.	Helsinki, Siilitie	4.6.2007	-	0,224	1,47	X		X
43.	Pirkkala, Metsäkuja	2.6.2007	+	0,312	1,5	X		X
44.	Pirkkala, Metsäkuja	2.6.2007	+	0,36	1,48	X		X
45.	Ruukki, MTT	7.6.2007	+	0,256	1,46	X		X
46.	Ruukki, MTT	7.6.2007	+	0,156	1,39			X
47.	Helsinki, Viikki	8.6.2007	+	0,32	1,32		X	X
48.	Ristiina	10.6.2007	+	0,232	1,47	X		X
49.	Ristiina	10.6.2007	+	0,34	1,5	X		X
50.	Ristiina	10.6.2007	+	0,286	1,5	X		X
51.	Ristiina	9.6.2007	+	0,066	1,5	X		X
52.	Ristiina	9.6.2007	+	0,124	1,51	X		X
53.	Ristiina	9.6.2007	+	0,152	1,8			X
54.	Ristiina	9.6.2007	+	0,384	1,5	X		X
55.	Ristiina	9.6.2007	+	0,22	1,6			X
56.	Ristiina	9.6.2007	+	0,44	1,5	X		X
57.	Ristiina	10.6.2007	-	0,228	1,5	X		X
58.	Ristiina	10.6.2007	+	0,272	1,3			X
59.	Ristiina	10.6.2007	+	0,232	1,4			X
60.	Ristiina	10.6.2007	+	0,564	1,5	X	X	X
61.	Ristiina	10.6.2007	+	0,356	1,42	X	X	X
62.	Sipoo, 1	5.6.2007	+	0,74	1,5	X	X	X
63.	Sipoo, 2	5.6.2007	+	0,382	1,46	X	X	X
64.	Helsinki, Lumikintie	5.6.2007	+	0,316	1,4			X
65.	Pirkkala 2	3.6.2007	+	0,28	1,45		X	X
66.	Pirkkala 1	2.6.2007	+	0,444	1,5	X		X
67.	Helsinki, Roihuvuori	3.6.2007	+	0,46	1,5	X		X
68.	Helsinki, Roihuvuori	3.6.2007	+	0,58	1,56	X	X	X
69.	Arriam Pushkin	29.6.2007	HYLÄTTY!					
70.	Turku, Uittamo	7.7.2007	+	0,152	1,36			X
71.	Turku, Uittamo	7.7.2007	+	0,22	1,2		X	X
72.	Turku, Uittamo	7.7.2007	+	0,408	1,2			X
73.	Turku, Uittamo	7.7.2007	+	0,456	1,15			X
74.	Turku, Uittamo	7.7.2007	+	0,324	1,27			X

Näytteistä eristettiin RNA Mielken ja Mühlbachin (2007) ohjetta soveltaen, ja RNA-pitoisuus mitattiin spektrofotometrillä. Tämän jälkeen RNA-näytteille tehtiin DNase-käsittely, jotta voitiin olla varmoja, ettei kasvin DNA vääristä tuloksia. DNase-käsitellyistä näytteistä valmistettiin cDNA:ta RT-PCR:ää varten.

RNA:n eristyksessä ja cDNA-synteesissä haasteita aiheuttivat epäpuhtaudet. Joidenkin näytteiden RNA-pelletti jäi värilliseksi (oranssi tai ruskea), vaikka pesukertoja lisättiin ja kokeiltiin erilaisia puhdistusmenetelmiä. Spektrofototrimittauksissa eristetyn totaali-RNA:n puhtaus (A_{260}/A_{280}) vaihteli lopulta välillä 1,2 – 1,9, kun puhtaan RNA:n $A_{260}/A_{280} = 2,0$.

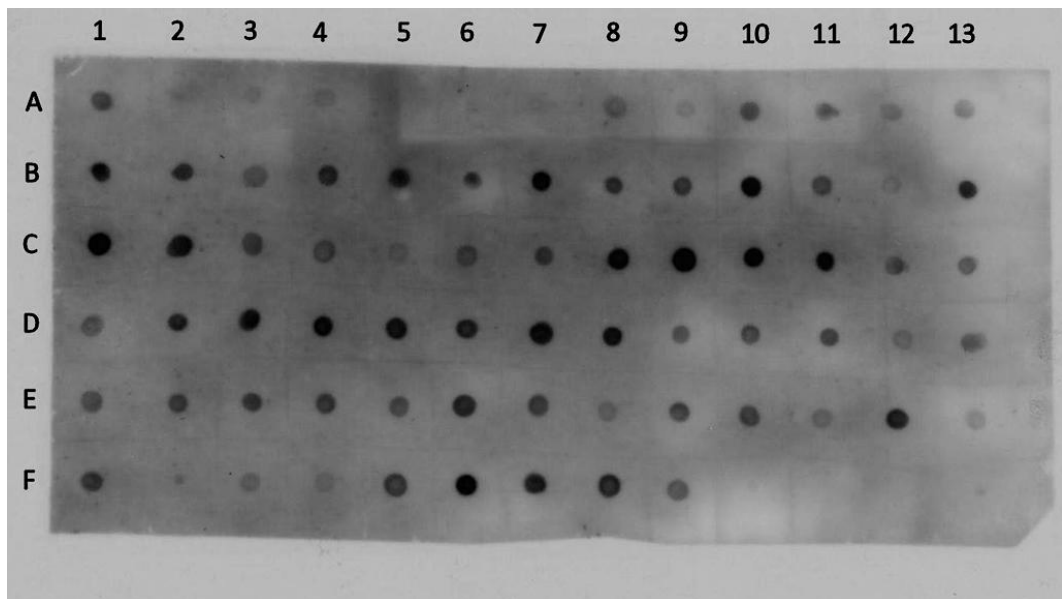
RT-PCR:ää varten suunniteltiin kaksi paria alukkeita EMARAV:in nukleokapsidiproteiinisekvenssin pohjalta. Ensimmäinen alukepari tuotti 383 nukleotidia pitkän tuotteen ja toinen 1160 nukleotidia pitkän tuotteen. 1160 nukleotidin mittainen PCR-tuote saatiin agarosigeelielektroforeesilla (kuva 7) näkyviin 35 näytteestä ja 383 nukleotidin mittainen 19 näytteestä (taulukko 2). 31 näytteestä ei saatu PCR-tuotetta kummallakaan alukeparilla.



Kuva 7. Kahdella eri alukeparilla tuotettujen RT-PCR-tuotteiden agarosigeelielektroforeesiajo. Ensimmäinen alukepari (1-4) tuotti 383 nukleotidia pitkän tuotteen ja toinen (5-8) 1160 nukleotidin mittaisen tuotteen. M oli markkeri (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas, St. Leon-Rot, Germany).

Kolmesta näytettä näistä RT-PCR:ssä negatiivisen tuloksen antaneista näytteistä oli kerätty oireettomista pihlajista ja loput 18 näytettä virusoireisista pihlajista. Näin ollen 17 oireettomasta näytteestä neljä antoi RT-PCR:ssä positiivisen tuloksen ja 13 negatiivisen

Dot blot –hybridisaatiossa jokainen näyte (73 kpl) antoi positiivisen tuloksen (kuva 8), myös oireettomat (17 kpl) näytteet. Joidenkin oireettomien näytteiden antama positiivinen tulos oli jopa voimakkaampi kuin joidenkin oireellisten. Positiivisen tuloksen voimakkuus ei myöskään liittynyt eristetyn RNA:n määrään (taulukko 2).



Kuva 8. Dot blot –hybridisaatiossa kaikki näytteet antoivat positiivisen tuloksen. Täplien voimakkuus vaihteli. Näytteet B8-B13, C1-C8, D3 ja E5 olivat oireettomista pihlajista. Negatiiviset kontrollit kohdissa F11 (dH₂O) ja F12 (alfa-tubuliini-plasmidi-DNA).

6 Tulosten tarkastelu

Se, ettei RT-PCR kaikkien näytteiden kohdalla onnistunut, johtui todennäköisesti RNA:n epäpuhtauksista, jotka häiritsivät cDNA-synteesiä. Ennen cDNA-synteesiä kaikki eristetyt totaali-RNA-näytteet DNAasi-käsiteltiin, joten näytteet olivat varmuudella puhtaita DNA:sta.

Dot blotissa positiivisina kontrolleina käytettiin DIG-leimattua RNA-koetinta, DIG-leimattua kontrolli-RNA:ta ja RT-PCR-tuotetta näytteestä numero 9. DIG-leimatut koetin ja kontrolli-RNA toimivat detektiokontrolleina kuten piti, eli antoivat positiivisen tuloksen DIG-vasta-aineen sitoutuessa leimaan. Myös RT-PCR-tuote antoi positiivisen tuloksen, sillä se sisältää koettimelle komplementaarisen virussekvenssin.

Negatiivisina kontrolleina dot blotissa käytettiin dH₂O:ta ja alfa-tubuliini-DNA:ta. Alfa-tubuliini-DNA:n antama negatiivinen tulos on tärkeä, sillä se varmistaa, ettei koetin sitoudu kasvissa kaiken aikaa ilmentyvään alfa-tubuliini-lähetti-RNA:han.

Varmennetusti viruksista puhdasta lehtinäytettä ei ollut saatavissa, joten yksi tärkeä negatiivinen kontrolli jäi puuttumaan. Oireettomasta näytteestä olisi uskottavuuden vuoksi ollut hyvä saada negatiivinenkin tulos.

7 Johtopäätökset

Virus näyttäisi siis olevan huomattavasti luultua yleisempi, kun tervettä näytettä oli vaikea löytää oireettomienkin puiden joukosta. Toiset pihlajat näyttävät vain sietävän virusta paremmin kuin toiset, ja infektiio jää latentiksi. Toisaalta, jotkut oireettomat näytteet antoivat dot blot – hybridisaatiossa huomattavasti voimakkaamman positiivisen tuloksen kuin

oireelliset näytteet, mikä tarkoittaa, että viruksen määrä kasvissa voi latentissa infektiossa olla jopa suurempi kuin silmin havaittavassa infektiossa.

EMARAV on Tšekissä löydetty muistakin *Sorbuksista* ja *Rosaceae*-heimon lajeista ja onnistuttu tartuttamaan myös esim. marja-aroniaan, päärynään ja omena. Nämä ovat taloudellisesti huomattavasti merkittävämpiä lajeja kuin pihlaja, mikä varmasti lisää kiinnostusta pihlajanrengaslaikkuviruksen levinneisyyden ja infektiomekanismien kartoittamiseen.

Vektori on vielä vahvistamaton, mutta viitteitä päärynänkämäpunkin (*Eriophyes pyri*) osallisuudesta infektoitumiseen on olemassa. Pihlaja leviää suvuttomasti hyvin voimakkaasti vesojensa avulla, jolloin läheiset puut ovat suorassa yhteydessä toisiinsa, ja virus pääsee leviämään helposti. Pihlajaa on käytetty myös puutarhoissa perusrunkona vartettaessa esim. riippapihlajia tai jopa hedelmäpuita.

Suvullisesti pihlaja leviää siementen avulla, kun linnut syövät marjoja ja kuljettavat siemeniä mukanaan. Siementen ja siitepölyn viruspitoisuus on kuitenkin vielä tutkimatta ja voisi antaa arvokasta tietoa viruksen leviämismekanismista.

8 Kiitokset

Työn ohjaajille professori Jari Valkoselle ja Anu Kalliselle

Lisäksi haluan kiittää lehtinäytteiden keruuseen osallistuneita henkilöitä.

9 Lähdeet

Agrios, G. & Lana, A. 1974. Properties of a strain of tobacco mosaic virus isolated from white ash trees. *Phytopathology* 64: 1490-95.

Agrios, G. 2005. *Plant pathology*. Fifth edition.

Alanko, P. 1988. Pihlajat - tulevaisuuden viherpuita ja -pensaita. *Puutarha* 91 (1988):5.

Alanko, P. 1988. *Puut ja pensaat*. Tammi.

Alanko, P. & Kahila, P. 1994. *Ukonhattu ja ahkeraliisa. Perinteiset koriste- ja hyötykasvit*. Tammi.

Arndt, N., von Bargen, S., Grubits, E., Jalkanen, R. & Büttner, C. 2009. Occurrence of EMARAV and CLRC in tree species native to Finland. In: Feldmann, F., Alford, D.V. & Furk, C. (eds.). *Crop plant resistance to biotic and abiotic factors. Proceedings of the 3rd international symposium on plant protection and plant health in Europe*. German Phytomedical Society (DPG), Braunschweig. 573-574.

Bi, Y., Tugume, A., & Valkonen, J. 2012. Small-RNA deep sequencing reveals *Arctium tomentosum* as a natural host of *Alstroemeria virus X* and a new putative Emaravirus. *PloS one*, 7(8), e42758

Benthack, W., Büttner, C., Mielke, N. & Mühlbach, H.-P. 2005. Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *Archives of virology* 150: 37-52.

Boom, R., Jansen, C., Salimans, M., Sol, C., van der Noordaa, J. & Wertheim-van Dillen, P. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology* vol 28, no 3: 495-503.

Bremer, K., Kurkela, T. & Lehto, K. 1991. Metsäpuiden virus- ja mykoplasmatauteja. *Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja* 382.

Bremer, K. , Tapio, E. & Valkonen, J. 1997. Viruses and their significance in agricultural and horticultural crops in Finland. *Agricultural and food science in Finland* 6 (1997): 4.

Campbell, A. I. & Sweet, J. B. 1976. Pome fruit virus infections of some woody ornamental and indigenous species of *Rosaceae*. *Journal of Horticultural Science* 51: 91-97.

Castello, J. D. & Nienhaus, F. 1989. Viruses in forest trees. *Annual Reviews of Phytopathology* 27: 165-86.

Cooper, J. I. 1979. *Virus diseases of trees and shrubs*, 2. painos. Lontoo: Chapman & Hall.

Ebrahim-Nesbat, F. & Izadpanah, K. 1992. Viruslike particles associated with ringfleck mosaic of mountain ash and a mosaic disease of raspberry in the Bavarian Forest. *European Journal of Forest Pathology* 22: 1-10.

Elbeaino, T., Digiario, M. & Martelli, G. P. 2009. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of virology* 154: 1719-1727.

Elbeaino, T., Digiario, M., Uppala, M. & Sudini, H. 2014. Deep sequencing of Pigeonpea sterility mosaic virus discloses five RNA segments related to emaraviruses. *Virus research* 188: 27-31.

Führling, M. & Büttner, C. 1995. Transmission experiments of viruses to woody seedlings (*Quercus robur* L. and *Sorbus aucuparia* L.) by grafting and mechanical inoculation. *European Journal of Forest Pathology* 25: 129-135.

Grimová, L., Marek, M., Konrady, M. & Ryšánek, P. 2014. Newly identified host range of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) and its distribution in the Czech Republic. *Forest Pathology*. doi: 10.1111/efp.12151.

Hibben, C. 1966. Transmission of a ringspot-like virus from the leaves of white ash. *Phytopathology* 56: 323-25.

Hibben, C., Bozarth, R. 1972. identification of an ash strain of tobacco ringspot virus. *Phytopathology* 62: 1023-29.

Hibben, C., Reese, J. & Castello, J. 1988. Identification of tomato ringspot virus in ash in New York. *Plant disease* 72: 175.

Jamalainen, E. A. 1957. Virustaudeista ja virustautien kaltaisista kasvitaudeista Suomessa. Valtion maatalouskoetoiminnan julkaisuja n:o 158.

Kallinen, A. K., Lindberg, I. L., Tugume, A. K. & Valkonen, J. P. T. 2009. Detection, distribution, and genetic variability of european mountain ash ringspot-associated virus. *Phytopathology* 99: 344-352.

Kegler, H. 1960. Das Ringfleckenmosaic der Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.). *Phytopathol Z* 37: 214-216.

Laney, A. G., Keller, K. E., Martin, R. R. & Tzanetakis, I. E. 2011. A discovery 70 years in the making: characterization of the Rose rosette virus. *Journal of General Virology* 92: 1727-1732.

McGavin, W., Mitchell, C., Cock, P., Wright, K. & MacFarlane, S. 2012. Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus Emaravirus, encodes a novel genomic RNA. *Journal of General Virology* 93: 430–437.

Mielke, N., Mühlbach, H. P. 2007. A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *Journal of General Virology* 88: 1337-1346

Mielke, N., Weber, M., Khan, S. & Mühlbach, H. P. 2008. Detection of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARAV) in *Sorbus aucuparia* L. by a specific antiserum and reverse transcription-PCR. *ForestPathology* 38: 371-380.

Mielke-Ehret, N., Thoma, J., Schlattermund, N. & Mühlbach, H. P. 2010. Detection of European mountain ash ringspot-associated virus-specific RNA and protein P3 in the pear blister mite *Phytoptus pyri* (Eriophyidae). *Archives of Virology* 155: 987-991.

Mielke-Ehret, N., Mühlbach, H. P. 2012. Emaravirus. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.*

Mielke-Ehret, N., Mühlbach, H. P. 2012. Emaravirus: A novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses* 2012, 4, 1515-1536.

Miller, G. R., Kinnaird, J. W. & Cummins, R. P. 1982. Liability of samplings to browsing on a red deer range in the Scottish Highlands. *Journal of Applied Ecology* 19: 941-951.

Ollikka, P. & Suominen, I. 2003. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet: 107-113. Opetushallitus.

Polák, Z. & Zieglerová, J. 1996. Towards ringspot and variegation in mountain ash leaves. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz . Journal of Plant Disease and Protection* 103:432-435.

Raspé, O., Findlay, C. & Jacquemart, A.-L. 2000. *Sorbus aucuparia* L. *Journal of Ecology* 88: 910-930.

Robel, J., Dieckmann, L., von Barga, S. & Büttner, C. 2013. First detection of European mountain ash ringspot-associated virus in rowan trees in Scotland. *New Disease Reports*, vol. 27, number 13.

Salminen, N.-M. Virtuaaliarboretum. Helsingin yliopisto. Metsätieteiden laitos.

http://www.helsinki.fi/metsatieteet/arboretum/puulajit/sorbus_aucuparia.html. Luettu 27.3.2014.

Valkonen, J. & Jalkanen, R. 2009. Viruksia metsäpuissa. Luonnon tutkija 1. <http://elektra.helsinki.fi/se/l/0024-7383/113/1/viruksia.pdf>. Luettu 27.3.2014.

Valkonen, J. & Rännäli, M. 2010. First Report of European mountain ash ringspot-associated virus in *Sorbus aucuparia* from Eastern Karelia, Russia. *Plant Disease*, volume 94, number 7, pages 921.2 - 921.2.

- von Bargaen, S., Arndt, N., Robel, J., Jalkanen R. & Büttner, C. 2013. Detection and genetic variability of European mountain ash ringspot-associated virus (EMARaV) in Sweden. *Forest Pathology* 43(5): 429-432.
- Woodward, S. & Pocock, S. 1996. Formation of the ligno-suberized barrier zone and wood periderm in four species of European broad-leaved trees. *European Journal of Forest Pathology* 26: 97-105.